

抵当汤及其拆方对糖尿病大鼠心肌 TGF- β_1 , TGF- β R II 及 Smad7 蛋白表达的影响

储全根¹, 刘新萍¹, 张凯², 毕华剑¹, 吴元洁¹, 周雪梅¹, 刘德胜¹, 董妍妍¹

(1. 安徽中医药大学 中医临床学院, 合肥 230038;

2. 安徽中医药大学 中西医结合临床学院, 合肥 230038)

[摘要] **目的:**探讨糖尿病对大鼠心肌转化生长因子- β_1 (TGF- β_1), 转化生长因子- β 受体 II (TGF- β R II) 及人信号转导分子 7 (Smad7) 蛋白表达的影响及抵当汤及其拆方的干预作用。**方法:**105 只 SD 雄性大鼠单次腹腔注射链脲佐菌素 (STZ) 建立糖尿病模型。成模后分为模型组、抵当汤干预组、水蛭虻虫组、桃仁大黄组和缬沙坦组, 以 12 只正常 SD 雄性大鼠作为正常组, 分别给予相应处理。8 周末, 利用全自动生化仪检测空腹血糖 (FBG), HE 染色观察心肌病理形态学变化, Western blot 法检测 TGF- β_1 , TGF- β R II 及 Smad7 蛋白的表达。**结果:**与正常组比较, 模型组大鼠心肌组织细胞肥大, 炎症细胞浸润较明显, 心肌 TGF- β_1 及 TGF- β R II 蛋白表达明显升高, Smad7 蛋白表达明显降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 抵当汤可以明显减轻糖尿病大鼠心肌组织的病理改变, 抵当汤明显下调大鼠心肌 TGF- β_1 蛋白及 TGF- β R II 蛋白表达, 明显上调 Smad7 蛋白表达 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。拆方组大鼠与糖尿病模型大鼠组比较, TGF- β_1 蛋白下调, 心肌组织损伤也有好转, 但均不如全方明显。**结论:**抵当汤可减缓糖尿病大鼠心肌纤维化病变, 其机制可能与下调糖尿病大鼠心肌中 TGF- β_1 和 TGF- β R II 蛋白表达, 上调 Smad7 蛋白的表达有关, 同时表明, 抵当汤全方对 DCM 病变的防治作用优于拆方, “泻热化瘀通络”治法与抑制 TGF- β_1 /Smad7 信号转导通路有关。

[关键词] 抵当汤; 糖尿病; 转化生长因子- β_1 ; 转化生长因子- β 受体 II; 人信号转导分子 7

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)01-0093-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016010093

Effect of Didang Tang and Its Split Recipes on Expression of Myocardium TGF- β_1 , TGF- β R II and Smad7 in Rats with Diabetes

CHU Quan-gen¹, LIU Xin-ping¹, ZHANG Kai², BI Hua-jian¹, WU Yuan-jie¹,
ZHOU Xue-mei¹, LIU De-sheng¹, DONG Yan-yan¹

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China;

2. College of Integrated Traditional and Western Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of diabetes on the expression of transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1), transforming growth factor- β receptors II antibodies (TGF- β R II) and signal transduction molecules 7 (Smad7) in rats myocardium and the intervention effects of Didang Tang and its split recipes. **Method:** The 12 healthy male SD rats were chosen randomly as normal group, and other 105 SD male rats were injected intraperitoneally with STZ to induce diabetes (DM) rat models, which were randomized into model group, Didang Tang group, leech and mang worm group, peach kernel and rheum officinale group, and valsartan group, receiving corresponding intervention. At the end of 8-week treatment, fasting blood glucose (FBG) was detected by full-automatic biochemical analyzer, pathomorphological change of myocardium was observed through hematoxylin-

[收稿日期] 20150213(017)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81273645)

[第一作者] 储全根, 博士, 教授, 从事中医药防治代谢性疾病研究, Tel:0551-68129303, E-mail:chuquangen@sohu.com

eosin staining, and the protein expression of TGF- β_1 , TGF- βR II and Smad7 were assessed by Western blot. **Result:** Compared with the normal group, cell hypertrophy was observed in myocardial tissues, with obvious infiltration of inflammatory cells, significant increase in TGF- β_1 , TGF- βR II expression and significant decrease in Smad7 expression ($P < 0.01$). Compared with the model group, Didang Tang could significantly down-regulate TGF- β_1 and TGF- βR II expression and significantly down-regulate Smad7 expression ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the diabetic rat models, the split recipe groups could down-regulate TGF- β_1 expression and improve myocardial damages, but the effect was inferior to that of whole prescription group. **Conclusion:** Didang Tang could relieve cardiac fibrosis of diabetic rats and its mechanism may be associated with down-regulating TGF- β_1 and TGF- βR II expression in myocardium of diabetic rats and up-regulating Smad7 expression. In addition, the prophylactic and therapeutic effect of Didang Tang was better than that of its split recipes. The treatment of 'expelling heat, removing blood stasis and dredging collaterals' was associated with inhibiting TGF- β_1 /Smad7 signal transduction pathway.

[Key words] Didang Tang; diabetes; transforming growth factor- β_1 ; transforming growth factor- β receptor II; signal transduction molecules7

糖尿病所伴发的特异性心肌病称为糖尿病心肌病 (diabetic cardiomyopathy, DCM), 常表现为心脏收缩和舒张功能的全面降低以及各种类型的心律失常^[1], 病理学改变的主要特征为心肌肥厚以及心肌纤维化。DCM 是一种独立于高血压、冠心病的疾病, 是 DM 的重要并发症和主要病死原因^[2]。中医学认为, DCM 的病机是燥热基础上伴脉络瘀阻, 并以瘀阻为主^[3]。

抵当汤出自东汉医圣张仲景所著《伤寒杂病论》, 由桃仁、大黄、水蛭、虻虫 4 味药物组成, 为治疗蓄血证之经典方剂, 具有逐瘀攻下、通络活血之功效。临床上可见用于糖尿病及其并发症的治疗, 对糖尿病的不同阶段及多种并发症如肾病、视网膜病变、冠心病、脑梗死等, 都可应用^[4-6]。但其对 DCM 的基础及临床治疗均未见报道。转化生长因子 β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1) 是目前已知的与组织纤维化形成关系最为密切的细胞因子^[7], TGF- β_1 /Smads 信号通路在心肌纤维化中的发生发展中发挥重要作用^[8]。本研究通过观察抵当汤对糖尿病大鼠心肌组织的形态学及 TGF- β_1 /Smad7 信号通路的影响, 探讨抵当汤对 DM 大鼠心肌纤维化的防治及可能的分子生物学作用机制。

1 材料

1.1 动物 雄性 SD 大鼠 117 只, 清洁级, 体重 (200 ± 20) g, 由安徽省实验动物中心提供, 合格证号 SCXK(皖)2011-0002。

1.2 药物及试剂 抵当汤剂的制备方法: 将水蛭 10 g, 虻虫 10 g, 桃仁 25 g, 熟大黄 15 g, 工艺以 10 倍量的水浸泡 2 h, 煮沸 1 h, 滤过, 药渣再用 8 倍量的

水煮沸 1 h, 滤过, 合并 2 次滤液并浓缩; 桃仁大黄制剂是桃仁 25 g 和熟大黄 15 g, 水蛭-虻虫制剂是水蛭 10 g 和虻虫 10 g, 配水及煎煮方法同上。链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ, 美国 Sigma 公司, 批号 20130320546), 总蛋白试剂盒 (中生北控生物科技股份有限公司, 批号 20131222), ECL 超敏发光试剂盒 (美国 Thermo 公司, 批号 NL178395)。

1.3 仪器 7160 型全自动生化仪 (日本日立公司), EPS 300 型电泳仪 (上海 Tanon 公司), VE-180 型电泳槽 (上海 Tanon 公司), VE-186 型转膜仪 (上海 Tanon 公司), BX51 型光学显微镜 (日本 Olympus 公司), LX 300 型微量离心机 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司), 倍佳血糖仪 (德国贝朗公司)。

2 方法

2.1 糖尿病大鼠造模方法^[9] 取 105 只健康雄性 SD 大鼠实验性喂养 1 周后, 禁食不禁水 10 h, 将 STZ 溶液按 55 mg·kg⁻¹ 剂量一次性 ip。72 h 后, 以刺尾静脉法测定非空腹血糖, 将非空腹血糖大于 16.7 mmol·L⁻¹ 者选定为糖尿病模型动物。

2.2 分组及给药 将 100 只糖尿病模型复制成功的大鼠随机分成 5 组, 每组 20 只, 即模型组、抵当汤干预组、水蛭虻虫组、桃仁大黄组和缬沙坦组。抵当汤干预组、水蛭虻虫组和桃仁大黄组, 每次 ig 前用蒸馏水配成质量浓度为 1 g·mL⁻¹ 的混悬溶液, 按体重分别给药 (10 mL·kg⁻¹), 每天 1 次; 缬沙坦组按 80 mg·kg⁻¹ 每天 1 次 ig 缬沙坦。以 12 只正常 SD 大鼠作为正常组, 正常组和模型组每次给予等体积的蒸馏水, 持续 8 周。

2.3 标本采集 8 周末, 在末次 ig 后空腹 10 h, 称

重,10%水合氯醛 3.0 mL·g⁻¹ ip 麻醉,腹主动脉取血后,快速打开胸腔,取出心脏,取左心室肌组织,切取部分置 4% 甲醛固定,余下组织 -80 °C 冰箱冻存,用于 Western blot 检测。

2.4 空腹血糖(FBG)测定 4 °C,3 000 r·min⁻¹,持续 10 min 分离血清,-20 °C 冰箱保存,采用日立全自动生化分析仪检测 FBG。

2.5 心肌组织标本制备 将左心室心肌组织以 4% 甲醛固定 5 d,常规脱水,石蜡包埋并切片,厚度为 5 μm,HE 染色,Olympus BX51 光学显微镜观察摄片。

2.6 Western blot 检测蛋白表达 提取心肌组织蛋白,经 BCA 试剂盒测定蛋白含量后进行 SDS-PAGE 电泳(浓缩胶 80 V,分离胶 120 V),半干法行蛋白转膜(60 V,120 min),5% 脱脂奶粉 37 °C 振摇封闭 1 h。加入一抗 4 °C 孵育过夜,二抗室温孵育 2 h。将 PVDF 膜置 ECL 混合液中室温震荡孵育 5 min。经洗涤、显影、定影、扫描后,以目的条带和内参条带 β-actin 表达量为对照观察结果。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 11.0 软件进行数据处理,实验结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,单因素方差分析,方差齐时用 LSD 检验进行多重比较,方差不齐时用 Dunnett's T3 检验进行多重比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠一般情况 8 周末,大鼠死亡 25 只,共剩余 87 只,其中正常组 12 只,模型组 12 只,抵当汤干预组 16 只,水蛭虻虫组 15 只,桃仁大黄组 15 只,缬沙坦组 17 只。

3.2 对糖尿病大鼠 FBG 的影响 与正常比较,模型组大鼠 FBG 水平明显升高($P < 0.01$)。与模型组比较,抵当汤干预组及其各拆方组有一定降糖趋势,但无统计学意义。见表 1。

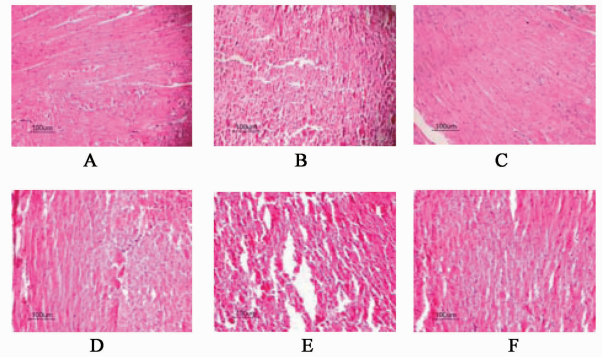
表 1 抵当汤及其拆方对大鼠 FBG 的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of Didang Tang and its splitted recipes on FBG of rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	FBG/mmol·L ⁻¹
正常	-	12	5.92 ± 1.15
模型	-	12	26.46 ± 5.69 ¹⁾
抵当汤	10	16	18.62 ± 6.01
水蛭虻虫	10	15	20.34 ± 6.60
桃仁大黄	10	15	18.92 ± 7.62
缬沙坦	0.08	17	17.71 ± 5.54 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

3.3 对心肌组织形态学的影响 正常大鼠心肌细胞排列整齐,细胞间隙较小;模型组大鼠心肌细胞肥大,排列紊乱,细胞纤维断裂,间隙增大,并见炎细胞浸润;与模型组比较,抵当汤干预组和缬沙坦组大鼠心肌细胞较整齐,细胞间隙小,细胞外基质减少;水蛭虻虫组和桃仁大黄组与模型组比较,心肌组织有改善,但不及抵当汤组明显。见图 1。

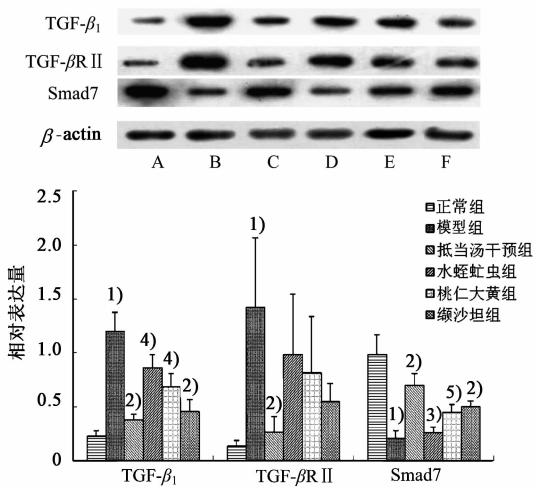


A. 正常组;B. 模型组;C. 抵当汤组;D. 水蛭虻虫组;E. 桃仁大黄组;F. 缬沙坦组(图 2 同)

图 1 抵当汤及其拆方对大鼠心肌组织形态学的影响(HE, ×200)

Fig.1 Effects of Didang Tang and its splitted recipes on cardiac morphology of rats (HE, ×200)

3.4 抵当汤及其拆方对糖尿病大鼠心肌组织 TGF-β₁, TGF-βR II, Smad7 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠心肌 TGF-β₁ 及 TGF-βR II 蛋白表达条带明显增粗,颜色加深,表明 TGF-β₁ 及 TGF-βR II 蛋白的表达增加($P < 0.01$),Smad7 蛋白明显变细,颜色浅,表达量减少($P < 0.01$),模型组大鼠心肌 TGF-β₁/Smads 通路被激活。与模型组比较,抵当汤干预组大鼠心肌 TGF-β₁ 蛋白及 TGF-βR II 表达明显减少($P < 0.01$),Smad7 蛋白显著增加($P < 0.01$),抵当汤抑制了 TGF-β/Smads 通路的活化;与模型组比较,水蛭虻虫组和桃仁大黄组 TGF-β₁ 蛋白表达下调($P < 0.01$),桃仁大黄组 Smad7 蛋白表达上调($P < 0.05$),水蛭虻虫 Smad7 蛋白无显著差异;两拆方组 TGF-βR II 表达与模型组比较无差异。与抵当汤干预组比较,水蛭虻虫组与桃仁大黄组大鼠心肌组织 TGF-β₁ 蛋白表达增多($P < 0.01$);桃仁大黄组大鼠心肌组织 Smad7 蛋白表达比水蛭虻虫组明显上升($P < 0.05$)。缬沙坦组与正常组相比,大鼠心肌 TGF-β₁ 蛋白表达明显减少($P < 0.01$),Smad7 蛋白显著增加($P < 0.01$),缬沙坦及抵当汤对大鼠心肌 TGF-β₁ 蛋白和 Smad7 蛋白的影响无明显差异。见图 2。



与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.05$; 与抵当汤干预组比较⁴⁾ $P < 0.01$; 与水蛭虻虫组比较⁵⁾ $P < 0.05$

图 2 抵当汤及其拆方对 TGF-β₁, TGF-βR II 和 Smad7 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 2 Effects of Didang Tang and its splitted recipes on expression of TGF-β₁, TGF-βR II 和 Smad7 protein ($\bar{x} \pm s$)

4 讨论

糖尿病心肌病是糖尿病的重要慢性并发症,其发病与糖尿病引起的全身各脏器的代谢紊乱相关,以心肌微血管病变、心肌肥厚和心肌组织进行性纤维化为特征,终末出现心力衰竭,心律失常等^[10]。其中心肌纤维化是糖尿病心肌病的重要特征,心肌间质中胶原大量沉着,能够降低心脏顺应性从而影响心脏的收缩及舒张功能^[11]。本研究通过 STZ 单次腹腔注射诱导糖尿病大鼠模型,造模成功后给予抵当汤及拆方灌胃治疗,以西药缬沙坦作为阳性对照药。研究发现,抵当汤及其拆方均无明显降糖作用,其对糖尿病心肌病的干预可能通过降糖外的其他途径。本实验中缬沙坦组的血糖均值与模型组有差异的原因不明,是否与该组大鼠的胰岛损伤自行恢复有关。

糖尿病据其临床症状、体征,在中医学中属于“消渴病”。糖尿病心肌病多发生于糖尿病的中、后期,出现心肌细胞肥大和心肌间质纤维化病变,导致心肌顺应性下降,符合中医“脉络瘀阻”病机。抵当汤具有泻热逐瘀通络作用,因此符合这一病机。方中水蛭咸苦性平,入肝、膀胱二经,专攻峻逐恶血瘀血,破血癥积聚;虻虫破血逐瘀之力更峻;大黄荡涤邪热,导瘀下行;桃仁破血行血^[12]。但其全方及两两组合的作用机制尚不明确,研究中将抵当汤全方拆解为中药桃仁大黄方与虫类水蛭虻虫方,试图了解全方及拆方的用途及疗效,发现无论在病理形态

学的保护,还是心肌纤维化相关蛋白的表达上,全方对糖尿病心肌的保护均优于拆方。

TGF-β₁ 及其下游分子 Smad 蛋白所构成的 TGF-β₁/Smads 信号通路在心肌纤维化病变中发挥重要作用^[13]。胞质内 Smads 蛋白的活化需要 TGF-β₁ 对其受体(TGF-βR II)的激活。TGF-β₁ 结合并激活 TGF-βR II 后,进一步激活下游的 Smads 蛋白信号,Smads 蛋白更改核基因的表达,从而导致心肌纤维化和心肌细胞肥大的发生。Smad7 是 TGF-β₁ 信号转导通路中的主要抑制因子,可以阻断 TGF-β₁ 信号通路的传导^[14]。

本研究结果显示,糖尿病模型大鼠心肌细胞肥大,细胞间隙增大,并有炎细胞浸润,心肌 TGF-β₁ 及 TGF-βR II 蛋白表达上调,抑制因子 Smad7 蛋白表达下调,说明在糖尿病的机体状态下,TGF-β₁ 信号通路被激活,其通过多种信号转导途径引起心肌间质纤维化和心肌细胞肥大,导致 DCM 的发生。而抵当汤干预组 TGF-β₁ 蛋白及 TGF-βR II 表达下调,Smad7 蛋白表达上调,说明抵当汤可以抑制 TGF-β₁/Smad7 信号传导通路,对 DCM 的心肌纤维化病变起抑制作用,在一定程度上说明“泻热化瘀通络”治法与抑制上述通路有关。心肌 HE 染色结果进一步证实了这一结论,抵当汤干预组大鼠心肌组织趋于正常。具有“化瘀通络”作用的拆方组一的水蛭虻虫组与模型组相比,TGF-β₁ 蛋白下调,Smad7 蛋白则未见明显变化,具有“化瘀泻热”作用的拆方组二的桃仁大黄组与模型组相比,TGF-β₁ 蛋白下调,Smad7 蛋白上调,两拆方组 TGF-βR II 表达均与模型组无差异,结合形态学结果,作者认为其对 DCM 病变的防治作用均不如全方。说明单纯的“化瘀泻热”或“化瘀通络”的效果不如具有“化瘀泻热通络”综合作用的全方的效果。

综上所述,TGF-β₁/Smad7 信号传导通路可能参与了糖尿病心肌纤维化的发生发展,抵当汤通过下调 TGF-β₁ 蛋白及其受体 TGF-βR II 以及上调 Smad 7 蛋白的表达,对 DCM 的发生发展起防治作用,并且具有“化瘀泻热通络”作用的全方的预防效果优于拆方。

[参考文献]

[1] 王岩,郭永川,梁前垒,等. 参麦注射液对糖尿病心肌病大鼠心肌纤维化的干预作用及相关机制探讨[J]. 中国病理生理杂志,2014,30(3):449-453.
[2] Battiprolu P K, Hojaye B, Jiang N, et al. Metabolic

- stress-induced activation of FoxO1 triggers diabetic cardiomyopathy in mice [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(3):1109-1118.
- [3] 仝小林. 糖络杂病论 [M]. 北京: 科学出版社, 2010:46.
- [4] 田佳星, 赵林华, 周强, 等. 抵当汤加减治疗糖尿病肾病微量蛋白尿的回顾性分析 [J]. 北京中医药大学学报: 中医临床版, 2012, 19(6):7-10.
- [5] 仝小林, 张昆, 段军, 等. 经方在糖尿病治疗中的运用 [J]. 中医杂志, 2002, 43(11):868-870.
- [6] 张玉辉. 抵当汤对 37 例 2 型糖尿病患者胰岛素抵抗的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2008, 28(2):161-162.
- [7] 邓长柏, 杨作成. 阻断 Smad3 表达对转化生长因子 β_1 诱导肌成纤维细胞增殖的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2008, 16(4):281-283.
- [8] Peart J N, Headrick J P. Sustained cardioprotection: exploring unconventional modalities [J]. *Vasc Pharmacol*, 2008, 49:63-70.
- [9] 张春虹, 臧伟进, 徐静, 等. 建立糖尿病心肌病动物模型方法的实验研究 [J]. 卫生研究, 2006, 35(6):707-711.
- [10] Fang Z Y, Prins J B, Marwick T H. Diabetic cardiomyopathy: evidence, mechanisms, and therapeutic implications [J]. *Endocr Rev*, 2004, 25(4):543-567.
- [11] 郑国营. 糖尿病心肌病舒张功能不全的研究进展 [J]. 医学综述, 2013, 19(9):1647-1649.
- [12] 王珍, 罗爱鄂. 抵当汤加味治疗子宫内位异位症 80 例 [J]. 广西中医药, 2009, 32(1):19-20.
- [13] Tang M, Zhong M, Shang Y, et al. Differential regulation of collagen types I and III expression in cardiac fibroblasts by AGEs through TRB3/MAPK signaling pathway [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65:2924-2932.
- [14] He J G, Chen Y L, Chen B L, et al. B-type natriuretic peptide attenuates cardiac hypertrophy via the transforming growth factor- β_1 /smad7 pathway *in vivo* and *in vitro* [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2010, 37(3):283-289.

[责任编辑 周冰冰]

《中国实验方剂学杂志》入选“2015—2016 RCCSE 中国核心学术期刊”

由武汉大学中国科学评价研究中心(RCCSE)、武汉大学图书馆、中国科教评价网(www.nseac.com)共同研制的第4版《RCCSE 中国学术期刊评价研究报告——权威、核心学术期刊排行榜(2015—2016)》已于2015年1月13日公布,《中国实验方剂学杂志》被评定为“RCCSE 中国核心学术期刊(A)”,在参评的112本中医学与中药学类期刊中综合排名第15名。

本次学术期刊评价在重点突出期刊学术影响力的同时,也注重了对期刊网络传播效率和期刊即时反应速率的考察,主要评价指标有:总被引频次、2年影响因子、即年指标、基金论文比、Web即年下载率、二次文献转载量(或国外重要数据库收录情况)和专家定性评价。参评期刊共6201种,排名前5%的“RCCSE 中国权威学术期刊”(A⁺)316种,排名前5%~20%的“RCCSE 中国核心学术期刊”(A)和排名前20%~30%的“RCCSE 中国核心学术期刊(扩展版)”(A⁻)共1572种,准核心的学术期刊1848种(B⁺),一般期刊1828(B)种,较差期刊637种(C)。

“RCCSE 中国核心学术期刊”是继“中文核心期刊(北大)”和“中国科技核心期刊”之后国内推出的又一核心期刊评价体系。